

**Vergleichende Untersuchungen über die
Bestimmung der 17-Ketosteroide, der
17-Ketogenen Steroide,
der 17-Hydroxycorticosteroide und der
17-Hydroxy-20-keto-21-methylsteroid bei
Gesunden und der Einfluß synthetischer
Corticosteroide
auf die Hypophysenvorderlappen-
und die Nebennierenrindensekretion**

Luise Kalmbach

1961

**Vergleichende Untersuchungen über die
Bestimmung der 17-Ketosteroide, der
17-Ketogenen Steroide,
der 17-Hydroxycorticosteroide und der
17-Hydroxy-20-keto-21-methylsteroid bei
Gesunden und der Einfluß synthetischer
Corticosteroide
auf die Hypophysenvorderlappen-
und die Nebennierenrindensekretion**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Luise Kalmbach
aus Duisburg-Meiderich

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL
Dekan: Professor Dr. Dr. H. EYER

Tag der mündlichen Prüfung: 7.3.1961



INHALTSÜBERSICHT

- A. Vergleichende Untersuchungen über die Bestimmung der 17-Ketosteroide, der 17-Ketogenen Steroide, der 17-Hydroxycorticosteroide und der 17-Hydroxy-20-keto-21-methylsteroiden bei Gesunden

I. Chemie der Nebennierenrinden-Hormonmetaboliten im Harn

1. Nebennierenrindensekretion
2. Intermediärer Abbau der Nebennierenrindenhormone
3. Allgemeine Nachweisverfahren der Nebennierenrinden-Hormonmetaboliten im Harn

Eigene Untersuchungen:

II. Methodik:

1. Allgemeine Probleme der Hydrolyse
2. Wismutatoxydation nach NORYMBERSKI
3. Borhydridreduktionsverfahren nach APPLEBY
4. Extraktion, Reinigung, Eindampfen
5. Colorimetrie
6. Genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung:
 - a) Mikromethode zur Bestimmung der 17-Ketosteroide nach VESTERGAARD
 - b) Bestimmung der 17-Ketogenen Steroide
 - c) Bestimmung der 17-Hydroxycorticosteroide
 - d) Colorimetrie ohne und mit Farbkorrektur
7. Kritik der Methoden

III. Normalwerte der 17-KS, 17-KGS, 17-OH-CS und 21-Methylsteroiden

1. Mittelwerte, S.D., mittlerer Fehler, methodischer Fehler
2. Vergleich der Mittelwerte mit anderen Methoden aus der Literatur
3. Einflüsse auf die Ausscheidung der Nebennierenrindenhormone
4. Eigene Versuchsergebnisse

- B. Untersuchungen über die Wirkung von Dexamethason auf die Hypophysenvorderlappen- und Nebennierenrindensekretion

IV. Hemmung der endogenen ACTH- und Nebennierenrindensekretion:

- a) durch Cortisol
- b) durch Dexamethason

V. Eigene Versuchsergebnisse

1. Bestimmung der Corticosteroide im Urin nach Durchführung des sog. "Cortison-Hemm-Testes"
2. Bestimmung der Nebennierenrindenmetaboliten nach Applikation des Steroids Dexamethason

VI. Besprechung des Dexamethasoneffekts

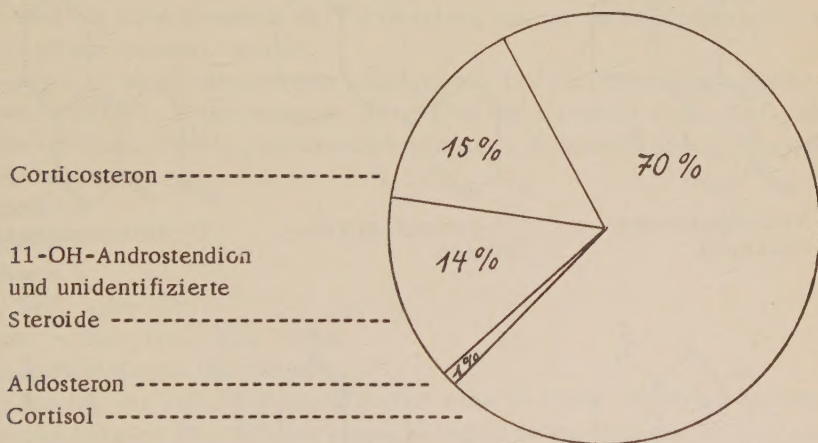
C. Zusammenfassung

D. Literaturnachweis

A.

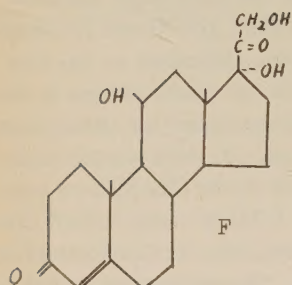
I. 1. Nach zahlreichen Untersuchungen an menschlichem Nebennierenvenenblut stellt das Cortisol (Compound F) die Hauptmenge der Nebennierenrinden-Hormone (NNRH) dar. Es folgt Corticosteron (Compound B) und in geringer Konzentration Cortison (Compound E). Die Nebennierenrinde (NNR) gibt ferner 11-Dehydrocorticosteron (Compound A) sowie geringe Mengen von Aldosteron an das Blut ab. Als physiologische Zwischenstufen in der Biosynthese der NNRH können in der NNR noch Cortexon (11-Desoxycorticosteron) und 17-Hydroxycortexon (Reichstein S) nachgewiesen werden. Es kommen weiterhin Androgene im Nebennierenvenenblut vor, von denen das Δ 4-Androsten-11 β - σ 1-3, 17dion sicher identifiziert werden konnte, während die Sekretion von Δ 4-Androsten-3, 17dion noch lebhaft diskutiert wird. Darüber hinaus wurden noch etwa 30 Metaboliten der Corticosteroide aus dem Nebennierenextrakt gewonnen, es sind die sog. "Spurencorticosteroide" (1). Die quantitative Zusammensetzung der in der NNR sezernierten Hormone geht aus der folgenden 1. Abbildung hervor. In der Abbildung 2 sind die biologisch wichtigen Corticosteroide formelmässig wiedergegeben.

Abbildung 1: Zusammensetzung der NNR-Sekretion

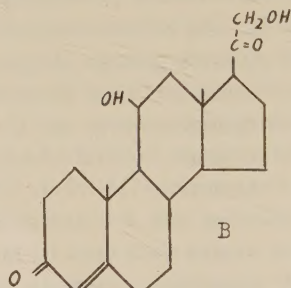


2. Die Corticosteroide mit der Seitenkette am C₁₇ werden hauptsächlich auf zwei Wegen abgebaut. Zunächst findet eine Reduktion der ungesättigten Bindung am Ring A statt. So entstehen z.B. aus Cortisol und Cortison die inaktiven Dihydro- und Tetrahydroverbindungen. Ausserdem kann eine Reduktion der Ketogruppen stattfinden und schliesslich eine Reduktion der endständigen Hydroxylgruppe an der Seitenkette, an C₂₁, zu einer Methylgruppe. Wie schon erwähnt, kann die 11-OH-Gruppe leicht durch Oxydation in eine Ketogruppe übergehen (Cortisol in Cortison). Diese Abbaustufen werden in der Leber mit Glucuron- und Schwefelsäure konjugiert und somit harnfähig gemacht. Daraus geht hervor, dass der Leber eine hervorragende

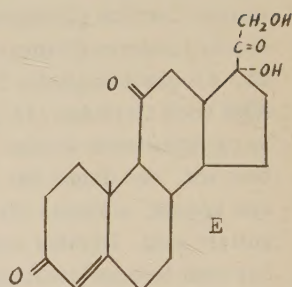
Abbildung 2: Chemische Formeln der wichtigsten NNRH



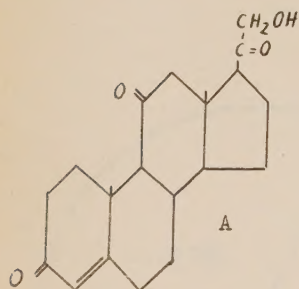
Cortisol



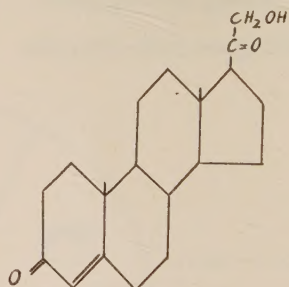
Corticosteron



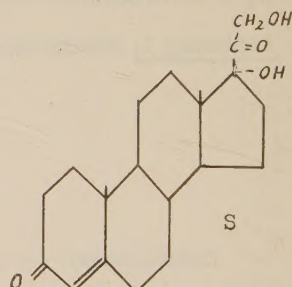
Cortison



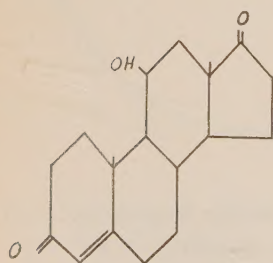
11-Dehydrocorticosteron



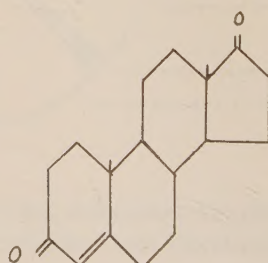
11-Desoxycorticosteron



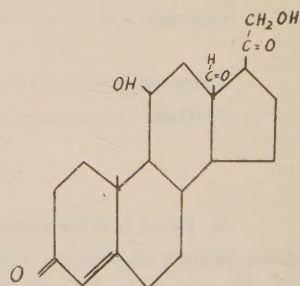
17-Hydroxycortexon



Δ -4-Androsten-11 β -ol-3,17dion



Δ -4-Androsten-3,17dion



Aldosteron

de Stellung im Steroidstoffwechsel zukommt, wie auch eindeutig aus Untersuchungen an Lebercirrhotikern hervorgeht (Bongiovanni u. Mitarbeiter) (2). Sie fanden eine deutliche Verminderung der Glucuronsäureconjugate im Plasma nach Steroidbelastung.

Ein Teil der Corticosteroid-Metaboliten wird in einer zweiten Abbaustufe unter Abspaltung der Seitenkette am C_{17} zu 17-Ketosteroiden oxydiert, die als solche ausgeschieden werden. Bei dem Abbau der 17- α -Ketolseitenkette geht die 11-OH-Gruppe nicht verloren, so dass 11-OH-17-Ketosteroide, und zwar 11-Keto-Ätanolon und 11- β -Hydroxyandrosteron entstehen. 17-Ketosteroide ohne die 11-Oxy-Gruppe wie Ätanolon, Androsteron, Dehydroepiandrosteron entstammen extraadrenalen Quellen oder aus 11-Desoxyverbindungen wie dem 17-Hydroxycortexon oder 17-Hydroxyprogesteron.

Ein geringer Teil der Corticosteroide unterliegt nicht diesen aufgezeigten Abbauvorgängen, sondern wird in seiner aktiven Form ausgeschieden.

3. Die NNR-Metaboliten, die an C_{17} eine Ketogruppe besitzen, können im Urin als 17-Ketosteroide direkt bestimmt werden. Dazu gehören Dehydroepiandrosteron, Androsteron, Ätiocholanolon, 11-keto- und 11 β -Hydroxyandrosteron und -ätiocholanolon und Adrenosteron. Zum quantitativen Nachweis der 17-Ketosteroide wird bei allen Methoden die Farbreaktion, die mit m-Dinitrobenzol in alkalischer Lösung entsteht, benutzt.

Die C_{21} -Metaboliten werden zum grössten Teil durch Oxydation an der C_{17} -Seitenkette in 17-Ketosteroide übergeführt und als solche durch die Farbreaktion mit m-Dinitrobenzol photometrisch bestimmt. Es gehören hierzu folgende Verbindungen:

Compound S

Compound F

Compound E

THE, THF, allo-THF

Pregnan - 3 α , 17 α , 20 α - triol

20 α - und 20 β -Cortol und Cortolon.

Dabei machen das THE, THF und allo-THF etwa 20 - 40%, das 20 α - und 20 β -Cortol und Cortolon 20 - 30% der ausgeschiedenen Hormonmengen im Urin aus.

Die beiden Substanzen 17- α -Hydroxyprogesteron und 3 α , 17 α -Dihydroxypregnan-20on werden durch das Oxydationsmittel nicht zu 17-Ketosteroiden verwandelt, weil sie keine Dioxyacetonseitenkette am C_{17} -Atom besitzen. Die Seitenkette dieser Substanzen, $>COH-CO-CH_3$, kann erst, wenn sie durch KBH_4 zu $>COH-CHOH-CH_3$ reduziert worden ist, durch das Oxydationsmittel in eine Ketogruppe umgewandelt werden, so dass diese beiden Steroide dann auch quantitativ bestimmt werden.

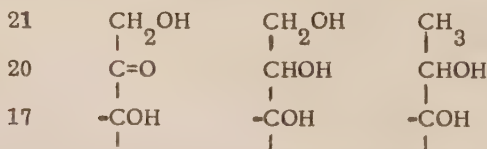
17-Hydroxycorticosteroide mit der Dihydroxyacetonseitenkette können auch mit der von Porter und Silber (3) angegebenen Farbreaktion mit Phenylhydrazin quantitativ bestimmt werden.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN:

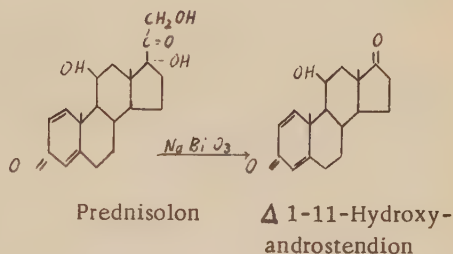
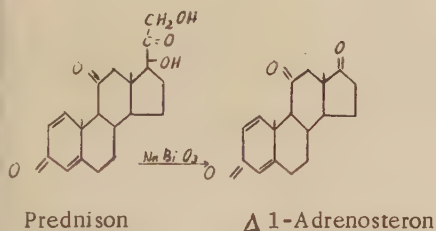
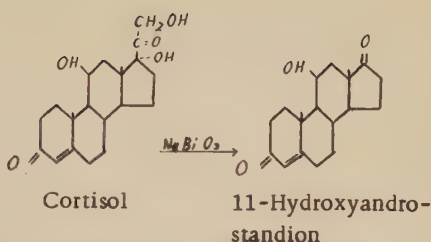
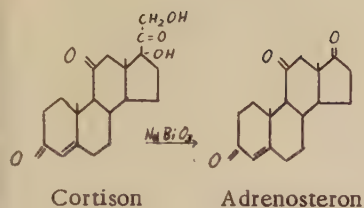
II. 1. Es wurde bereits erwähnt, dass nur ein geringer Teil der Corticosteroide in biologisch aktiver Form ausgeschieden wird. Die Corticosteroide werden hauptsächlich in biologisch inaktiver, wasserlöslicher, gebundener Form eliminiert. Der Ring A ist reduziert und die Steroide sind in C₃-Stellung konjugiert an die Glucuron- bzw. an die Schwefelsäure. Um diese Steroide aus dem Urin in organischen Lösungsmitteln zu konzentrieren, muss man sie hydrolysieren. Erhitzt man diese gebundenen Steroide mit konz. HCl, so erreicht man die völlige Hydrolyse für die sehr labilen säure- und hitzeempfindlichen 17-OH-Corticosteroide. Eine alleinige Säurehydrolyse ohne Erhitzung würde nur die Schwefelsäureester spalten, während die Glucuronide nicht erfasst werden. Daher hat man enzymhydrolytische Methoden mit verschiedenen Glucuronidasepräparaten angewandt, die jedoch nicht die Schwefelsäureester erfassen.

Es gibt indessen eine ganz andere Möglichkeit, wie man grössere Verluste von thermolabilen Corticosteroiden bei der Hydrolyse vermeiden kann. Wie schon erwähnt, können nämlich gewisse Corticosteroidtypen durch Oxydation mit Natriumwismutat (NaBiO₃) in 17-Ketosteroide umgewandelt werden. Sobald die konjugierten Corticosteroide zu 17-Ketosteroiden oxydiert sind, ist die grosse Empfindlichkeit der Moleküle für Mineralsäuren und Hitze erheblich herabgesetzt, und sie können dann einer Säurehydrolyse ausgesetzt werden. Nach der Wismutatoxydation ist aber auch schon ein Teil der glucuronidgebundenen Corticosteroide verseift. Die Säure- und Hitzehydrolyse darf nicht zu angreifend sein, weil dann ein Teil der Hormonderivate zerstört oder umgelagert wird. Andererseits muss sie aber genügend wirksam sein.

2. Dass die Corticoide mit der Hydroxylgruppe am C₁₇-Atom routinemässig bestimmt werden können, hat Norymberski (1952/53) (4) mit Hilfe der Natriumwismutatoxydation gezeigt. Die Seitenketten am C₁₇ vom Typ



werden durch Natriumwismutat zu Ketogruppen umgewandelt. Formelmässig wird der Reaktionsablauf an einigen Beispielen aufgezeigt.



Exakt wurde die Brauchbarkeit der Wismutatreaktion nach Norymberski von Schriebers und Korus (5) geprüft. Sie arbeiteten mit Reinsubstanzen Cortison, Cortisol, Prednison, Prednisolon und 9-Fluor-hydrocortison und fanden, dass es wichtig ist, eine ausreichende Wismutatmenge bei der Oxydation zu verwenden, da bei einer Wismutat-Steroid-Relation von 1 : 500 nach einer Oxydationszeit von 30 min 44% von der Ausgangssubstanz nicht oxydiert werden. Dagegen war bei gleicher Reaktionszeit die Oxydation bei einer Steroid-Wismutat-Relation von 1 : 4000 vollständig. Diese Relation ist auch von Norymberski (6) für die routinemässige Bestimmung der 17-OH-Corticosteroide im Urin angegeben und auch von uns übernommen worden.

Da bei der Wismutatoxydation noch andere Veränderungen am Steroidmolekül entstehen können, ist die Dauer der Einwirkung des Wismutats einzuschränken. Bei 30 min langer Oxydation, wie sie von Norymberski in der Originalmethode angegeben wird, ist die Wiederfindung der Hormone nach Versuchen von Schriebers und Korus vollauf befriedigend. Es ist daher nicht nötig, eine Oxydationszeit von 300 min, wie sie von Diczfalusy empfohlen wird, zu wählen.

Von Breuer und Nocke (7), ebenso von Diczfalusy und Mitarb. (8) wird noch auf die Bedeutung verschiedener Präparate von NaBiO_3 bei der Oxydation hingewiesen. Es wurde bei der Verwendung von p. a. Merck-Wismutat eine geringere Ausbeute als mit dem englischen Anala R Präparat erzielt.

Störend auf die Wismutatoxydation wirkt die Anwesenheit von reduzierenden Zuckern im Harn ein. Daher empfiehlt es sich, vor der Aufarbeitung den Urin auf Zucker zu prüfen. Ein gewisser Nachteil liegt in der von Norymberski angegebenen Bestimmung der 17-Hydroxycorticosteroide (17-OH-CS) darin, dass man zunächst erst einmal die neutralen 17-Ketosteroide (17-KS) im Harn in einem gesonderten Analysengang bestimmen muss, da bei der Wismutatoxydation die neutralen 17-KS und die durch das NaBiO_3 umgewandelten 17-OH-CS erfasst werden. Diese Summe entspricht den "totalen 17-Ketosteroiden". Durch Abzug der eigentlichen 17-KS von den "totalen 17-KS" erhält man die 17-Ketogenen Steroide (17-KGS), die die 17-Hydroxycorticosteroide repräsentieren. Die rechnerisch ermittelte Differenz aus zwei chemisch bestimmten Werten, der "totalen 17-KS" und der eigentlichen 17-Ketosteroide, hat bei dieser Methode eine gewisse Fehlerquelle zur Folge.

3. Eine direkte Bestimmung der 17-OH-CS wurde 1954 von Appleby (9) angegeben. Diese Methode beruht darauf, dass die neutralen 17-KS durch Na- oder K-Borhydrid, einem starken Reduktionsmittel, in Alkohole verwandelt und alle genuinen 17-KS dadurch zerstört werden. KBH_4 reduziert weiterhin die 21,17-diol, 20 on - Kette zu 21,17,20 triol, die 21 - methyl, 20 on - 17 - ol - Kette zu 21 - methyl, 20,17 diol. Nach der Reduktion schliesst sich die Wismutatoxydation an, so dass im Anschluss daran die C_{21} -Steroide als 17-KS quantitativ bestimmt werden. Durch die direkte 17-OH-CS-Bestimmung mit Borhydrid werden C_{21} -Steroide vom Typ $\text{CH}_3\text{-CO-COH}$ noch mit erfasst, die allein mit der Wismutatoxydation nicht bestimmt werden. Da diese Verbindungen normalerweise nicht in grösseren Mengen im Urin ausgeschieden werden, weichen die Ergebnisse beider Methoden nur in bestimmten pathologischen Fällen sehr voneinander ab. Trotzdem beschreibt Diczfalusy (10), dass die direkt bestimmten 17-OH-CS-Werte um 25% höher liegen als die der 17-KGS-Werte. Der Grund dafür ist der, dass durch das NaBiO_3 das DHEA zerstört wird und daher die Werte der "totalen 17-KS" zu tief liegen.

4. Im Gang der Analyse schliesst sich an die Oxydation mit NaBiO_3 die Hydrolyse an. Auf die Probleme der Hydrolyse wurde bereits ausführlich hingewiesen. Die darauf folgende Extraktion der 17-KS-Fraktion erfolgt mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel. Von den vielen theoretisch zur Verfügung stehenden Fettlösungsmitteln eignen sich besonders Äther für die 17-KS und Chloroform für die Corticoide. Von Dreker und Mitarb. (11) wurden systematische Untersuchungen an 17-Ketosteroiden durchgeführt, die zeigten, dass Äthylendichlorid, Chloroform, Methylendichlorid, Isopropyläther, Äthyläther und Benzol gleich gute Extraktionsmittel sind.

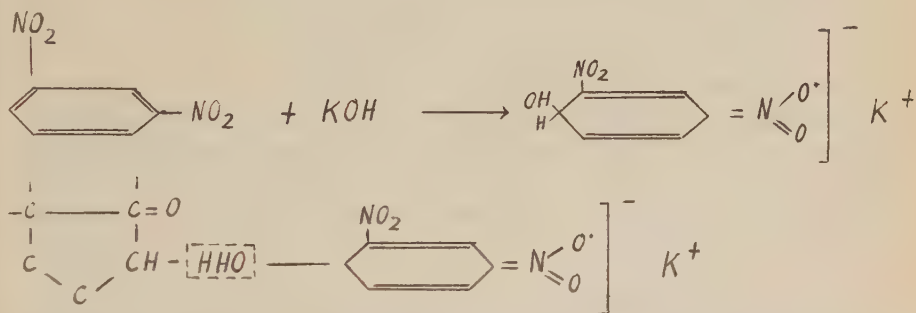
Damit bei der Extraktion keine Emulsionsbildungen auftreten, wird das Volumen des Extraktionsmittels grösser als das der zu extrahierenden Harnmenge gewählt.

Da Harnfarbstoffe, besonders Urochrome und gefärbte Kunstprodukte der

Hydrolyse, die Harnextrakte oft stark färben, muss man eine Reinigung des Extraktes von diesen störenden Pigmenten vornehmen. Dies geschieht durch die Behandlung mit Natronlauge.

Den Trockenrückstand erhält man nach Eindampfen des Extraktes im Wasserbad.

5. Zimmermann (12) entdeckte als erster 1935, dass Steroidhormone quantitativ mit m-Dinitrobenzol bestimmt werden können, M-Dinitrobenzol bildet in Anwesenheit von Kalilauge mit Verbindungen, die eine aktive Methylengruppe besitzen, eine violette Farbe. Bei der Reaktion lagert sich zuerst die Lauge an den Polynitrokörper zu einer Chinolnitrosäure. Danach kondensiert sich die Chinolnitrosäure mit der Methylengruppe. Die Reaktion verläuft also folgendermassen:



Der violette Farbstoff hat ein ganz charakteristisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum im grünen Bereich bei 510 - 530 mμ. Zimmermann hat seinerzeit die Reaktion mit wässriger Kalilauge angegeben; es hat sich aber gezeigt, dass trotz vorhergegangener Reinigung des Extraktes mit NaOH die Farbreaktion von unbekannten Chromogenen gestört wird. Sie entwickeln eine gelbbraune sich überlagernde Farbe. Durch Messung in zwei Spektralbereichen und Anwendung einer entsprechenden Korrekturformel lässt sich der störende Einfluss der Chromogene eliminieren. 1952 haben Zimmermann, Anton und Pontius (13) die Farbreaktion dahingehend verbessert, dass der Farbstoff mit Äther oder Chloroform ausgeschüttelt wurde. In der wässrigen Phase, die verworfen wurde, waren die Verunreinigungen weitgehend enthalten, weswegen sich eine Messung in zwei Spektralbereichen mit Korrektur erübrigt. Eine weitere Abwandlung hat die m-Dinitrobenzolreaktion mit C₁₇-Steroiden durch Wu und Chou (14) 1937 erfahren. Sie haben den Reaktionsansatz in absolut-alkoholischer statt in wässrig-alkoholischer Lösung und die nachträgliche Verdünnung der entwickelten Farbe mit Alkohol eingeführt. Diese abgeänderte Form der Farbreaktion wurde 1938 von Callow (15) übernommen. Die Modifikation nach Callow ist heute die verbreitetste.

6. Zur Bestimmung der 17-OH-CS im Urin wurden von uns 24-Std-Sammelurine untersucht. Die Probanden wurden angewiesen, den ersten Urin morgens zu Beginn des Sammelns am ersten Tag zu verwerfen und dann von 8 Uhr bis zum nächsten Tag 8 Uhr zu sammeln. Der Urin wurde von uns sofort gemessen und ohne Zusätze weiterverarbeitet.

a) Da wir bei der indirekten KGS-Bestimmungsmethode zunächst die neutralen 17-KS bestimmen müssen, haben wir die Untersuchungen nach der von Vestergaard (16) 1951 angegebenen Mikromethode durchgeführt.

2 ml Urin werden mit 0,3 ml konz. HCl 15 min in einem Glycerinbad bei 100 - 110°C hydrolysiert. (Rückflusskühler) Das Hydrolysat wird abgekühlt und mit 8 ml Äthyläther im Scheidetrichter 3 min lang kräftig geschüttelt. Nachdem sich die wässrige Phase abgesetzt hat, wird sie abgelassen und zum Extrakt 2 ml aqua bidest. einpipettiert und geschüttelt. Das Wasser wird abgelassen und die Reinigung mit 2 ml aqua bidest. nochmals wiederholt. Abschliessend wird der Hormonätherextrakt mit 8 NaOH-Plätzchen geschüttelt, wodurch die restlichen Verunreinigungen und verbleibendes Wasser beseitigt werden. Der Extrakt wird filtriert und in einem Spitzgläschen aufgefangen. Der Scheidetrichter wird mehrmals mit Äther nachgewaschen, sodann wird der flüssige Extrakt bei 45°C im Wasserbad unter Herstellung eines Vakuums abgedampft. Der Trockenrückstand wird quantitativ colorimetrisch bestimmt.

b) Die 17-KGS bestimmten wir in Anlehnung an die Originalmethode nach Norymberski (17, 4), wobei wir uns an eine Beschreibung der Methode zur Bestimmung der 17-OH-CS von Birke, Diczfalussy und Platin (10) hielten.

Vom 24 Std - Urin werden 8 ml in einen mit Schliff versehenen Erlenmeyerkolben einpipettiert und mit 8 ml Eisessig versetzt. Dazu werden 3 g NaBiO_3 gegeben und das ganze 2 Std im Dunkeln mechanisch geschüttelt. Dann wird der Inhalt in Zentrifugengläser abgefüllt und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert und gut durchgeschüttelt, davon werden 2,5 ml in einen Erlenmeyerkolben abpipettiert, mit 3 Tropfen einer frisch hergestellten 5%igen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung versetzt (zum Abstoppen der Oxydation). Es wird umgeschüttelt, der Inhalt wird mit 2,5 ml aqua bidest. verdünnt und mit 0,5 ml rauchender HCl angesäuert. Diese Flüssigkeit wird im Glycerinbad 15 min bei 100 - 110°C hydrolysiert. Das abgekühlte Hydrolysat wird 3 min mit 8 ml Äther im Scheidetrichter geschüttelt. Die wässrige Phase wird verworfen und der Ätherextrakt mit 2 ml aqua bidest., 2,5 ml 3n NaOH und 2ml Wasser gewaschen. Zum Schluss wird der Extrakt mit 10 NaOH-Plätzchen gereinigt und filtriert. Durch Abdampfen im Wasserbad bei 45°C erhält man den Trockenrückstand für die Farbreaktion.

c) Zur Bestimmung der 17-OH-CS benutzten wir das von Appleby (18) angegebene Borhydrid-Reduktionsverfahren und arbeiteten nach der von Birke, Diczfalussy und Plantin (10) beschriebenen Methode. Dabei behielten wir uns Abänderungen vor.

Zu 8 ml Urin gaben wir 40 mg festes KBH_4 , nach kräftigem Umschütteln liessen wir die Substanz über Nacht einwirken. An diese Reduktion schliesst sich die Wismutatoxydation, Hydrolyse und Extraktion wie bei der Bestimmung der 17-KGS an.

d) Die kolorimetrische Bestimmung der 17-KS geht wie folgt vor sich: Zum Trockenrückstand wird 0,2 ml einer frisch zubereiteten 2%igen alkoholischen m-Dinitrobenzollösung und 0,4 ml einer 1,25 n alkoholischen Kalilauge einpipettiert. Ebenso wird in ein leeres Röhrchen 0,2 ml m-Dinitrobenzollösung und 0,4 ml abs. alk. KOH pipettiert, das bei der Colorimetrie als Reagentienleerwert dient. Die 1,25 n KOH wurde von uns nach der Vorschrift von Hamburger (19) zubereitet, 8 g KOH-Plätzchen wurden unter Zusatz von Ascorbinsäure in kochendem Alkohol gelöst (40 mg Ascorbinsäure auf 100 ml Äthanol). Die KOH wurde mehrfach filtriert und gegen 1,25 n HCl titriert. Unter Licht- und Luftabschluss wurde diese Lösung bei ca 2 - 4°C aufbewahrt und jede Woche frisch angesetzt. Durch den Zusatz von Ascorbinsäure ist die Haltbarkeit der alkoholischen Kalilauge gewährleistet.

Die angesetzten Proben wie die Reagentienleerprobe werden in einem Wasserbad bei konstanter Temperatur von 25°C lichtgeschützt 60 min lang gehalten. Danach wird mit 3,4 ml Äthanol verdünnt, und es wird die Farbe des Urinextraktes gegen die der Reagentienleerprobe bei einer Schichtdicke von 1 cm am Photometer (Elko II) gemessen. Die Ergebnisse werden ausgedrückt in mg Dehydroepiandrosteron-Äquivalenten pro 24 Std Urinmenge.

Die Farbreaktion eignet sich deswegen zur quantitativen Bestimmung der Corticoide, weil das Beersche Gesetz von der Proportionalität zwischen Konzentration und Farbtiefe, unter der Bedingung, dass Reagentien, Reaktionsdauer und Temperatur konstant bleiben, erfüllt ist. Da also eine lineare Abhängigkeit zwischen der Extinktion und der Hormonkonzentration besteht, haben wir zur Berechnung der uns unbekannten Hormonmengen in den zu untersuchenden Sammelurinen eine Eichkurve angelegt. Als Eichlösung diente eine 10 mg %ige alkoholische DHEA-Lösung (100 mg DHEA in 1 l Alkohol gelöst). Davon wurden

je 4 mal 0,1 ml (10 % DHEA)

je 3 mal 0,2 ml (20 % DHEA)

je 4 mal 0,3 ml (30 % DHEA)

je 2 mal 0,4 ml (40 % DHEA)

je 4 mal 0,5 ml (50 % DHEA)

je 2 mal 1,0 ml (100 % DHEA)

in Glasröhrchen abpipettiert und eingedampft, mit den DHEA-Trockenrückständen wurde die beschriebene Farbreaktion durchgeführt und die violetten Farbstoffe, die das charakteristische Absorptionsspektrum mit Maximum bei 510 - 530 m μ aufweisen, bei 530 m μ photometrisch gemessen. Die graphische Darstellung der gefundenen Extinktionen in Abhängigkeit von der DHEA-Konzentration stellt Abbildung 3 dar. Es zeigte sich, dass eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration nur im Bereich von 0,02 - ungefähr 0,1 mg DHEA besteht. Bei sehr geringen und bei hohen Hormonkonzentrationen weichen die Extinktionen von der Gera-

den ab. Daher wurden bei den Urinuntersuchungen die Versuche stets wiederholt, wenn die Hormonkonzentrationen sehr hoch waren. Der Urin wurde dann im Verhältnis 1 : 1 mit Wasser verdünnt. Anhand der Eichkurve lässt sich aus dem Verhältnis Konzentration zu Extinktion ein Faktor zur Berechnung der 17-KS-Mengen im Urin ermitteln. Der Faktor, den wir bei unseren Versuchen verwendeten, beträgt 86,6. Bei den ersten 12 Normalbestimmungen wurde die Colorimetrie nur bei einer Wellenlänge bei 530 $m\mu$ durchgeführt und die Versuchsergebnisse ohne Korrektur erhalten. Es wurden also die störenden Chromogene quantitativ mit erfasst, so dass die Ergebnisse infolgedessen zu hoch waren. Aus der Arbeit von Jørgensen (20) geht hervor, dass die Anwendung einer Farbkorrektur zwar gewöhnlich genauere Werte ergibt als eine Berechnung, die nur auf der Messung bei einer Wellenlänge basiert; aber er hat festgestellt, dass die Anwendung der Farbkorrektur mitunter zu viel zu niedrigen Ergebnissen führt. Er schreibt weiterhin, dass die Anwendung einer Farbkorrektur nur dann wichtig ist, wenn die Absorptionskurve des Urinextraktes wesentlich von der reinen Hormonlösung abweicht, was gewöhnlich nicht der Fall ist. Auch wir haben Absorptionskurven zweier Urinextrakte mit der Absorptionskurve einer DHEA-Lösung verglichen und fanden keinen wesentlichen Unterschied im Verlauf der Kurven (Abbildung 4). Die DHEA-Absorptionskurve hatte ihr Absorptionsmaximum bei 520 $m\mu$, das Maximum der Urinextraktkurven lag bei 510 $m\mu$, wie aus der Abbildung zu ersehen ist.

Trotzdem haben wir uns dazu entschlossen, bei unseren weiteren Steroiduntersuchungen die Farbkorrektur, die bei der Standard-Methode des MRC-Committees zur Bestimmung der 17-KS angewandt wird und von Talbot et al. (21) angegeben wurde, zu benutzen. Die Ablesungen der Farbstoffe am Photometer erfolgen dabei ständig mit einem Grünfilter bei einer Wellenlänge von 530 $m\mu$ und einem Blaufilter bei einer Wellenlänge von 420 $m\mu$. Es lässt sich eine korrigierte grüne Extinktion nach folgender Formel berechnen:

Korrigierte grüne Extinktion =

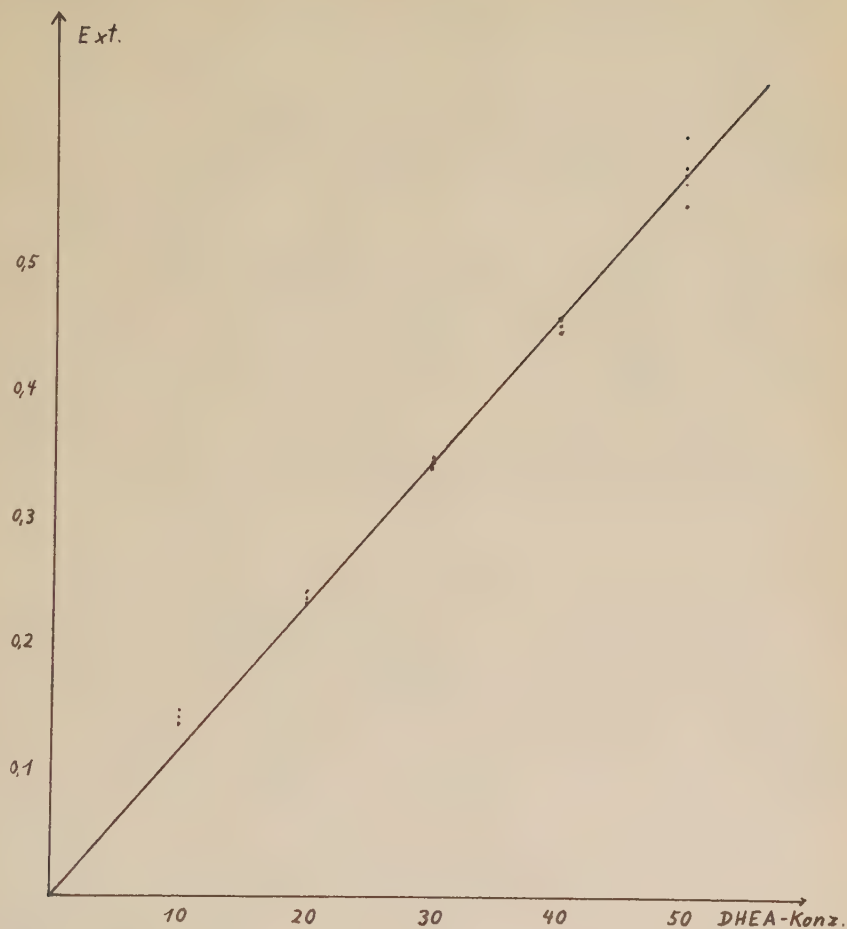
$\frac{\text{abgelesene grüne Extinktion} - 0,6 \times \text{abgelesene violette Ext.}}{0,73}$

0,73

Die so erhaltenen Werte sind ungefähr 2 mg niedriger als die Ergebnisse, die man ohne Korrektur errechnen würde. Wir haben uns deswegen zu der Korrektur entschlossen, weil wir aus Versuchen mit KBH_4 ersahen, dass nach Zerstörung der eigentlichen 17-KS und anschliessender 17-KS-Bestimmung die Ergebnisse nicht, wie man hätte erwarten sollen, negativ verliefen. Es wurden im Gegenteil immer noch 17-KS gefunden, und zwar in einem Fall von 16,4 mg 17-KS nach Zerstörung durch KBH_4 noch 3,4 mg, in einem anderen Fall von 13,2 mg noch 2,9 mg.

Das Absorptionsspektrum dieser mit KBH_4 vorbehandelten Urinextrakte hat kein Maximum mehr und, verglichen mit der DHEA-Absorptionskurve, nichts mit dieser gemein. Die Kurve zeigt einen ständigen Abfall vom niedrigen zum hohen Spektralbereich (siehe Abbildung 4). Daraus schlossen wir, dass es sich hier um spezifische Chromogene handeln muss, die mit m-Dinitrobenzol eine Farbe im alkalischen Milieu erzeugen, also auch Licht bei der Photometrie absorbieren.

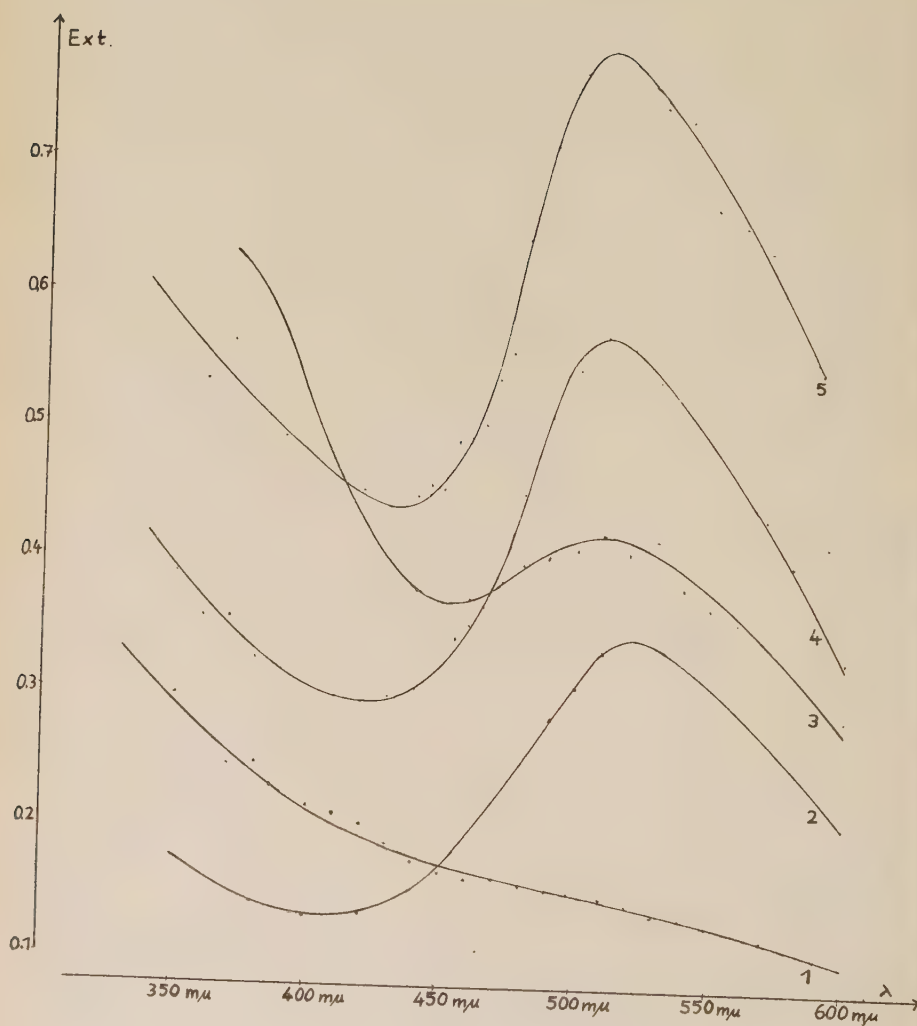
Abbildung 3: Eichkurve



Messergebnisse:

conz.	Ext.	Ext.	Ext.	Ext.	Ext. m.	Fakt. conz. :Ext.	Fakt. m.
10	0.137	0.146	0.144	0.146	0.143	-	<u>86.6</u>
20	0.235	0.237	0.239	-	0.237	84.4.	
30	0.340	0.350	0.349	0.346	0.346	86.7	
40	0.450	0.455	-	-	0.452	88.5	
50	0.553	0.588	0.560	0.608	0.577	86.7	
100	1.046	1.061	-	-	1.053	-	

Abbildung 4:



- Absorptionskurven:
1. 17-KS-Bestimmung nach KBH_4 -Reduktion
 2. 30 μ DHEA-Hormonlösung
 3. 17-KS-Bestimmung ca 20 μ Hormonkonz.
 4. 17-OH-CS-Bestimmung ca 50 μ Hormonkonz.
 5. 17-KS-Bestimmung ca 70 μ Hormonkonz.

Nach Anwendung der Farbkorrektur konnte bewiesen werden, dass durch KBH_4 die 17-Ketosteroide bei genügend langer Einwirkung wirklich zerstört werden. Es fanden sich einmal von 6,5 mg/24 Std.-Urin noch 0,2 mg und von 18,3 mg/24 Std.-Urin noch 0,4 mg wieder.

Die Anwendung der Farbkorrektur erwies sich bei Fällen vorteilhaft, bei denen der Einfluss von Dexamethason geprüft wurde. Hierbei zeigte es sich bei einigen Untersuchungen, dass die Ausscheidung der NNRH durch dieses Mittel vollkommen unterdrückt und die Ergebnisse durch die Mitbestimmung der Chromogene nicht verfälscht wurden.

Beim Vergleich der statistischen Auswertung, die die Versuchsergebnisse nach potenziertem ACTH-Belastung zeigt - 12 Versuchsserien ohne colorimetrischer Korrektur und 13, bei denen zur Berechnung die Farbkorrektur benutzt wurde - lässt sich jedoch kein wesentlicher Unterschied in den Endergebnissen herausstellen, weswegen beide Ergebnisse gleich gut verwertet werden konnten. (siehe Diss. Jenner (22))

Bei sämtlichen Hormonbestimmungen wurden von uns Doppelversuche durchgeführt; wenn die beiden Ergebnisse stark voneinander abwichen, wurden die Versuche wiederholt.

Zu den Analysen wurden ausschliesslich p. a. Merck Reagentien verwandt.

7. Zur Bestimmung der 17-KS wurde, wie beschrieben, die Mikromethode nach Vestergaard (16) angewandt. Man könnte hier einwenden, dass in 2 ml Urin, der Untersuchungsmenge, normalerweise etwa 20 μ g Hormonmengen enthalten sind und dass bei dem relativ langen Analysengang bei diesen geringen Hormonkonzentrationen zu grosse Verluste auftreten. Dieser Einwand ist jedoch nicht berechtigt, denn es hat sich gezeigt, dass die Untersuchungen nach der Mikromethode, verglichen mit der Methode, die in unserem Labor bisher eingeführt war, in allen Fällen höhere Werte ergaben. Bei der früheren Methode wurde eine Ausgangsurinmenge von 10 ml verarbeitet; die Farbreaktion wurde nach Zimmermann (13) mit Chloroformausschüttelung ausgeführt. Die Vergleichsergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Es sind fast nur Untersuchungen an pathologischen Fällen durchgeführt worden. Hiermit ist der gleiche Einwand für die KGS- und 17-OH-CS-Bestimmungen widerlegt.

Zur quantitativen Analyse der 17-OH-CS wurde, wie ebenfalls ausführlich dargelegt, nach der Beschreibung der Methode von Diszfalusy (10) gearbeitet. Bei dieser Methode soll eine frisch zubereitete KBH_4 -Lösung verwendet werden. Da das Reagens KBH_4 sehr teuer ist und die Lösung frisch zubereitet werden soll, lösten wir in 5 ml H_2O 1 g KBH_4 . Das KBH_4 in Lösung zu bringen, war äusserst schwierig, es entstand eine stark gesättigte Lösung, die bei Zimmertemperatur sofort wieder ausfiel. Die Kristalle setzten sich in den Pipetten fest, so dass es nicht möglich war, 0.2 ml der KBH_4 -Lösung zum Urin hinzuzufügen. Wir umgingen das Problem dadurch, dass die Substanz in fester Form hinzugefügt wurde. KBH_4 soll nach den vorgeschriebenen Angaben 1 Std. einwirken. Diese Dauer hat sich nach unseren

Versuchen als zu kurz erwiesen, da nach dieser Dauer die 17-KS noch nicht restlos zerstört sind; wir liessen daher, wie es in der Originalmethode nach APPLEBY et al. (18) angegeben ist, das Reduktionsmittel über Nacht einwirken.

Als störend bei der reduzierenden Einwirkung von KBH_4 auf die 17-KS im Urin zeigte sich das vorherige Ansäuern des Urins mit Essigsäure. Es war üblich, dass jeder Urin, der morgens von den Stationen ins Labor kam, sofort mit etwas Essigsäure zur Konservierung angesäuert wurde. Da KBH_4 aber auch die Essigsäure reduziert, geht ein Teil vom Reagens für die Reduktion der 17-KS verloren. Für die Zersetzung von KBH_4 wäre ein alkalisches Milieu (23) günstiger; das hat aber den Nachteil, dass gewisse Steroide davon wiederum ungünstig beeinflusst werden. Wir führten unsere Versuche aus den eben erwähnten nachteiligen Gründen weder mit einem sauren noch mit einem basischen Zusatz durch.

Die Reinigung des Ätherextraktes soll nach der Vorschrift mit dest. Wasser, 3n NaOH und NaOH-Plätzchen vorgenommen werden. Auffallend war nun, dass bei der Bestimmung der 17-KS, bei der der Ätherextrakt nur mit H_2O und NaOH-Plätzchen gereinigt wurde, der Farbansatz nach der einstündigen Entwicklung im Dunkeln und anschliessenden Verdünnung mit Äthanol immer klar war und die Ergebnisse der Doppelversuche fast immer gut übereinstimmten, während andererseits oft die Farbansätze der "totalen 17-KS" und 17-OH-CS trübe waren und sich die Hormonkonzentrationen daher photometrisch nicht ermitteln liessen. Zusätzlich führten wir daher noch eine Waschung des Ätherextraktes mit aqua bidest. nach der Reinigung mit 3n NaOH durch. Die Trübung war jetzt seltener zu beobachten, ausserdem führten wir von vorneherein immer 3 Bestimmungen der 17-KGS und 17-OH-CS eines 24 Stunden-Urins aus. Das bedeutet natürlich eine verlängerte Arbeitszeit bei dem ohnehin schon ziemlich zeitraubenden Analysengang.

Tabelle 1: Vergleichende 17-KS- und 17-KGS-Bestimmungen

Farbreaktion nach Zimmermann mit wässriger KOH und Chloro- formausschüttelung. Ausgangsurinmenge: 10 ml			Farbreaktion nach Callow ohne Farbkorrektur Ausgangsurinmenge: 2 ml (1,25 ml)	
Nr.	17-KS mg/24 h	17-KGS mg/24h	17-KS mg/24 h	17-KGS mg/24h
1	28.7	51.7	35.8	79.5
2	26.6	54.2	29.8	69.4
3	21.5	52.7	30.8	82.7
4	30.3	53.0	39.0	74.8
5	11.7	8.7	18.5	13.4
6	12.1	13.5	20.7	21.3
7	14.6	17.6	18.5	32.7
8	13.5	6.3	15.2	14.7
9	13.9	9.7	17.9	10.2
10	13.8	37.9	22.1	43.8
11	13.0	17.2	18.4	24.9
12	5.3	21.9	12.1	32.5
13	34.1	66.7	41.3	89.1
14	4.6	4.7	6.3	4.9
15	6.8	5.9	5.9	10.1
16	3.3	4.9	4.4	9.7
Summe	253.8	426.6	336.7	613.7
Mittelwert	15.8	26.7	21.0	38.3

III. 1. Da es unsere Aufgabe war, zu prüfen, wie die NNR beim Gesunden durch ACTH stimuliert wird (Jenninger (22)) bzw. durch die Zuführung eines synthetisch hergestellten Steroidhormons in ihrer Funktion gehemmt wird, ist es wichtig, zunächst einmal die normalen Ausscheidungswerte bei Gesunden für die 17-KS, die 17-KGS, die 17-OH-CS und für die 17-Hydroxy-10-keto-21-methylsteroid, die nach den oben angeführten Methoden bestimmt werden, zu kennen.

Wir führten daher bei 35 Probanden jeweils an zwei aufeinanderfolgenden Tagen die 17-KS, 17-KGS und 17-OH-CS-Bestimmungen durch. Die Probanden waren weibliche Patienten der Klinik, die nur dann zu den Untersuchungen herangezogen wurden, wenn eine Krankheit, die die Nebennierenrindenfunktion beeinflussen könnte, auszuschliessen war, oder wenn eine entzündliche Krankheit längere Zeit schon abgeklungen war. Dabei muss allerdings hinzugefügt werden, dass die Probanden nur eingeschränkt als normal bezeichnet werden können, da möglicherweise schon der Klinikaufenthalt als aussergewöhnliche Situation mit Rückwirkung auf die Nebennierenrindenfunktion zu werten ist.

Die ersten 12 Versuchsergebnisse erhielten wir, ohne dass eine Farbkorrektur zur Berechnung der Endergebnisse angewandt wurde. Da aber die Mittelwerte nicht wesentlich von den Ergebnissen abwichen, die mittels einer Farbkorrektur berechnet wurden, wurde ein gemeinsamer Mittelwert für alle 35 Versuchsergebnisse zusammengestellt.

Der Mittelwert für die 17-KS liegt in der Höhe von 8,7 mg/24 Std.-Urin bei einer Standardabweichung von ± 2.63 mg und einem mittleren Fehler des Mittelwertes von 0,45 mg.

Für die 17-KGS-Werte wurde ein Mittelwert von 13.0 mg/24 Std.-Urin ermittelt bei einer Standardabweichung von ± 3.0 mg und einem mittleren Fehler des Mittelwertes von 0.51 mg.

Bei der direkten Bestimmung der 17-OH-CS ergab sich ein Mittelwert von 18.1 mg/24 Std.-Urin, eine Standardabweichung von ± 3.76 mg und ein mittlerer Fehler des Mittelwertes von 0.64 mg.

Als Differenz der 17-OH-CS und der 17-KGS lässt sich für die 17-Hydroxy-20-keto-21-methylsteroidoide ein Mittelwert von 5.1 mg/24 Std.-Urin mit einer Standardabweichung von ± 2.24 mg und einem mittleren Fehler des Mittelwertes von 0.38 mg errechnen. Wie schon erwähnt, wird von Diszfalusy (10) angegeben, dass die 17-OH-CS ungefähr 25% höher liegen als die 17-KGS. Aus unseren Versuchsergebnissen resultiert dagegen ein Unterschied von 39% im Durchschnitt. Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Autoren sind leider z. Z. noch nicht möglich.

Die Standardabweichung S.D. berechnet sich nach der Formel:

S.D. = $\sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}$, wobei d die Abweichung der Einzelbestimmungen vom Mittelwert und n die Anzahl der Bestimmungen ist.

Der mittlere Fehler des Mittelwertes lässt sich nach der Formel:

$$^m S.D. = \frac{S.D.}{\sqrt{n}} \text{ berechnen.}$$

Um den methodischen Fehler festzustellen, wurden zu Beginn der Versuche zunächst einmal Mehrfachbestimmungen eines normalen Urins durchgeführt. Dabei wurde die Farbkorrektur angewandt. Die Werte dieser Mehrfachbestimmungen zeigt Tabelle 2. Die entsprechenden statistischen Berechnungen zu diesen Ergebnissen sind aus Tabelle 3 zu ersehen.

Tabelle 2: Ergebnisse von 10 Mehrfachbestimmungen eines 24 Std.-Urins.

17-KS	(mg/24 h)	11.8	13.1	12.9	12.4	12.8
		13.0	12.9	13.4	13.0	13.5
17-KGS	(mg/24 h)	12.3	9.6	9.1	9.7	11.9
		9.5	11.8	9.7	10.0	9.6
17-OH-CS	(mg/24 h)	14.0	13.7	13.6	14.7	13.5
		16.0	13.3	15.8	14.1	14.7

Tabelle 3: Ergebnis der statistischen Auswertungen zu den Versuchsergebnissen von
Tabelle 2

	Mittelwert mg/24 h	methodischer Fehler	S. D.	m S. D.
17-KS	12.9	± 0.475	± 0.327	0.103
17-KGS	10.32	± 1.18	± 0.795	0.252
17-OH-CS	14.34	± 0.95	± 0.63	0.2

Der methodische Fehler wurde nach der Formel:
$$\sqrt{\frac{\sum d^2 - m \sum d}{n - 1}}$$

berechnet. Die Auswertungen ergeben, dass bei einem 17-KS-Mittelwert von 12.9 mg/24 Std. ein methodischer Fehler von 3.7 % vorliegt, der bei einem so langdauernden Analysengang durchaus zufriedenstellend ist. Bei der 17-KGS-Bestimmung liegt der prozentuale Fehler bei einem Mittelwert von 10.32 mg in Höhe von 11.5 %, dabei ist zu berücksichtigen, dass der Fehler sich durch die Bildung der Differenz zwischen totalen 17-KS und den genuine 17-KS wesentlich erhöht. Der Fehler bei der direkten Bestimmung der 17-OH-CS beläuft sich bei einem Mittelwert von 14.34 mg auf 6.6 %.

2. Zum Vergleich unserer Normalwerte für die 17-KGS-Ausscheidung im 24 Std.-Urin seien einige Normalwerte, die mit verschiedenen geläufigen Corticosteroidbestimmungsmethoden erhalten wurden, in der folgenden Tabelle aus der Literatur zusammengestellt.

Tabelle 4: Normalwerte der 17-KGS aus der Literatur

Autorenverzeichnis	Anzahl d. Fälle ♂	17-KGS mg/24 h	Anzahl d. Fälle ♀	17-KGS mg/24 h
Norymberski et al. 1953	7	9.6-19.2	9	4.6-13.4
Diszfalusy et al. 1955	17	11.1-22.1	20	6.9-17.9
Moxham and Nabarro 1955		5.0-22.2		4.0-18.2
Schüller 1956	100	16.4	125	10.6
Borth et al. 1957	90	11.0	82	8.0-9.0
Jørgensen 1957	206	11.5	180	8.0
Husslein u. Schüller	100	17.0	125	10.0
Laros	185	12.0-20.0		4.0-12.0
Fogitt u. Steinbeck	15	3.5-15.5	18	4.9-18.2
Sobel, Colub, Henry, Jak., Basu 1958		8.0-25.0		5.0-18.0

Für die Bestimmung der 17-OH-CS sind aus der Literatur noch wenig Normalwerte zu ersehen, da diese Methode in den Laboratorien noch nicht lange Anwendung findet. Moxham und Nabarro geben für männliche Personen als Normalwerte für die 17-OH-CS-Ausscheidung 8.0-21.8 mg im 24 Std.-Urin, für weibliche 4.6-17.0 mg an. (24)

3. Grundsätzlich wurden von uns die Nebennierenrindenhormonausscheidungen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt, da die Ausscheidung der Steroide von vielen Faktoren beeinflusst wird und die Hormonausschüttung grossen Tagesschwankungen unterliegt. Einen Überblick über die Schwankungsbreite der Corticoidausscheidung bei einer klinisch unauffälligen Person stellt die Tabelle 16 der Arbeit von Raftopoulos, Staudinger und Weissbecker dar (25); es beträgt der Mittelwert der KGS-Ausschüttung 22.85 mg/24 Std bei einer biologischen Streuung von 5.8 mg/24 Std, einer Standardabweichung von 2,4 mg/24 Std. und einer Normalabweichung vom Mittelwert von ± 4.8 mg/24 Std.. Die Tagesschwankungen sind auch zu ersehen aus den Versuchen von Jørgensen (20), der die Urine von gesunden Frauen während der Dauer eines ganzen Menstruationszyklus untersucht hat, und daraus resultierte ein Ausscheidungsminimum beispielsweise bei einer Versuchsperson von 4.6 mg/24 Std. und ein Ausscheidungsmaximum von 8.6 mg/24 Std.. Es empfiehlt sich also, um ein Bild von der normalen Nebennierenrindenfunktion zu bekommen, das Mittel aus zwei zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Bestimmungen zu nehmen, um nicht durch zufallsbedingte Stressituationen unspezifischer Art einer Täuschung zu unterliegen.

Zu diesem Stress, der eine signifikante Erhöhung der Hormonwerte erzeugt, gehört beispielsweise eine aussergewöhnliche körperliche und psychische Belastung oder eine Operation.

Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass die Hormonausschüttung einem bestimmten Tagesrhythmus unterliegt, weswegen zur Untersuchung immer der Sammelurin von 24 Stunden verwandt wird. Es ist nämlich die Ausscheidung von 17-KS und 17-KGS morgens am höchsten und während der Nacht am niedrigsten.

Die Sekretion der NNRH ist ausserdem abhängig vom Alter. So findet man die höchsten Ausscheidungswerte bei Frauen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren (26). Im Senium sinken die Werte wieder fast auf die der Kindheit ab.

Dass die Hormonproduktion geschlechtsabhängig ist, geht deutlich aus Tabelle 4 hervor. Die normalen Steroidwerte beim Manne sind etwas höher als bei der Frau.

Anhand der Hormonausscheidungsbestimmungen lässt sich ebenfalls eine Abhängigkeit der Werte vom Gewicht der Patienten erkennen. So liegen die Ausscheidungswerte von Adipösen, ohne dass eine Störung der NNR-Funktion vorliegt, tiefer als bei Personen mit normalem Gewicht. Möglicherweise besitzen die Corticosteroide eine grosse Affinität zum Fettgewebe, so dass ein grösserer Verteilungsraum der Hormone in der Peripherie resultiert.

Die Hormonausscheidung ist auch unterschiedlich in den geographischen Breiten. So findet man bei Bantunegern im Vergleich zu Europäern wesentlich niedrigere 17-KGS-Werte im Urin. (27)

4. Wie schon beschrieben wurden von uns die Normalwerte aus 35 Einzelbestimmungen für die 17-KS, 17-KGS, 17-OH-CS sowie für die 17-Hydroxy-20-keto-21-methylsteroid im 24 Std.-Urin ermittelt. Aus Tabelle 5 gehen die Versuchsergebnisse mit der statistischen Auswertung hervor; die graphische Darstellung

der Mittelwerte mit der Standardabweichung und dem mittleren Fehler des Mittelwertes soll in Abbildung 5 gezeigt werden.

Tabelle 5: Versuchsergebnisse der 17-KS, 17-KGS, 17-OH-CS und der 17-Hydroxy-20-keto-21-methylsteroid

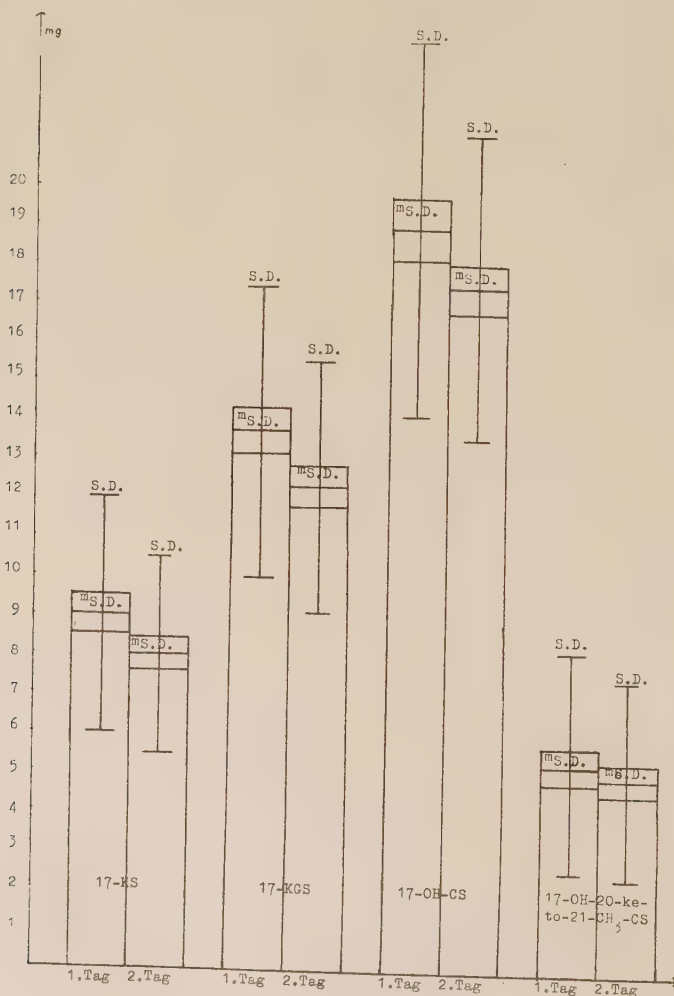
Pat.	17-KS mg/24 h		17-KGS mg/24 h		17-OH-CS mg/24 h		17-Hydroxy-20- keto-21-methylst. mg/24 h	
	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
PE	9.5	7.9	13.2	7.1	18.8	12.8	5.6	5.7
JU	11.9	6.4	16.2	12.3	32.1	16.4	15.9	4.1
ME	13.8	11.6	13.1	11.3	24.5	29.5	11.4	18.1
KR	7.3	8.9	11.0	12.3	11.2	14.4	0.2	5.1
SC	8.3	11.7	10.6	10.9	16.3	18.9	5.7	8.0
SM	26.8	20.2	19.0	8.4	3.8	15.8	14.8	7.4
KO	11.0	6.9	27.0	11.0	30.1	13.4	3.1	2.4
HA	13.0	13.6	11.5	13.7	18.5	23.5	7.0	9.8
MO	13.8	14.2	14.6	16.4	25.4	21.5	10.8	5.1
BI	7.9	6.9	11.8	8.7	16.4	17.2	4.6	8.5
FL	7.5	8.4	11.4	20.8	13.5	22.4	2.1	1.6
BA	10.6	6.2	8.5	11.0	24.2	16.2	15.7	5.2
ZE	2.8	3.3	9.2	7.9	13.0	11.8	3.0	3.9
PO	7.7	8.4	10.6	16.7	13.8	23.0	3.2	6.3
ST	4.4	5.8	7.5	10.0	9.8	10.5	2.3	0.5
GR	6.7	4.8	14.5	13.7	18.7	14.7	4.2	1.0
BA	11.2	10.3	14.0	13.8	18.0	19.6	4.0	5.8
WO	5.2	4.4	26.1	16.1	29.2	29.2	3.1	4.5
SA	10.6	10.8	17.3	13.1	24.3	20.6	7.0	7.5
SN	8.5	6.7	26.1	23.4	30.0	28.4	3.9	5.0
SO	7.6	9.1	13.5	24.5	14.2	26.3	6.7	1.8
GA	6.0	5.9	19.0	11.8	20.9	15.6	1.9	3.8
MA	9.7	11.2	10.8	8.7	15.0	15.0	4.2	6.3
WE	7.4	8.7	12.5	7.5	20.9	16.8	8.1	9.3
MU	6.7	5.7	14.4	14.3	18.2	18.3	3.8	4.0
BO	3.9	5.6	9.1	9.5	10.3	10.7	1.2	1.2
SD	11.3	9.0	12.3	13.6	16.7	14.3	4.4	0.7
SR	5.8	5.5	8.3	7.6	12.6	10.3	4.3	2.7
VA	5.1	4.7	8.6	6.4	9.1	9.8	0.5	3.4
TR	10.1	11.0	7.5	8.7	11.7	14.6	4.2	5.9

(Fortsetzung nächste Seite)

FE	8.2	5.3	9.8	9.2	19.3	12.6	9.5	3.4
GU	4.8	3.8	8.1	8.2	9.9	11.8	1.8	2.8
SW	11.7	10.5	23.3	20.3	27.3	29.2	4.0	8.9
PÜ	13.5	12.0	16.8	15.5	23.0	20.8	6.8	5.3
GL	4.4	3.7	10.7	8.2	13.2	9.1	2.5	0.5

m	9.0	8.3	13.7	12.3	18.9	17.4	5.3	5.0
S.D.	+3.0	+2.5	+3.7	+3.2	+4.8	+3.9	+2.9	+2.5
m _{S.D.}	+0.5	+0.4	+0.6	+0.5	+0.8	+0.7	+0.5	+0.4

Abbildung 5: Graphische Darstellung der NNRH-Ausscheidung im Urin



B. IV. a) Ein wichtiger diagnostischer Test zur Klärung einer Funktionsstörung der NNR ist die Bestimmung der Harnmetaboliten nach einer intravenösen Injektion von 100 mg Cortisol. Das Cortisol übt eine bremsende Wirkung auf den Hypophysenvorderlappen aus, so dass die Nebenniere nach Gaben von Cortisol vermindert Hormone ausschüttet. Da aber das Cortisol zu einem Teil im Urin wieder ausgeschieden wird, ist es schwierig, den Einfluss des zugeführten Steroids auf die Nebennierenrindentätigkeit festzustellen.

Aus Versuchen an adrenaletomierten Patienten geht nun interessanterweise hervor, dass etwa 30 - 40% von der zugeführten Steroidmenge im Urin wieder erscheinen. Dafür sprechen auch Isotopenversuche mit 4-C^{14} -Cortisol. Anhand dieser Ergebnisse kann nach Verabreichung von Cortisol ungefähr die Hemmung der endogenen Hormonproduktion der NNR ermittelt werden, die in der Klinik als "Cortisol-Hemm-Test" Anwendung findet. Durch exogene Zufuhr von Corticosteroiden lässt sich mit Hilfe eines solchen Testes oft differentialdiagnostisch eine beidseitige Hyperplasie der NNR, die durch eine vermehrte ACTH-Inkretion entsteht, von einem einseitigen NNR-Tumor, der autochthon und unabhängig von der homöostatischen Regulation Hormone produziert und damit nicht durch exogenes Cortisol in seiner Eigensekretion gehemmt wird, unterscheiden.

Da man für therapeutische Zwecke die natürlichen Corticosteroide, Cortisol und Cortison, meist in einer Dosis von 50 - 150 mg verabfolgen muss, die zu etwa 30% im Urin wieder erscheinen, geht aus einer Corticoidbestimmung doch nicht eindeutig der Einfluss der zugeführten Hormone auf die NNR-Funktion hervor. Es ist deshalb wichtig, die Wirksamkeit des therapeutisch angewandten Steroids auf die NNR genau zu erfassen, da es bei einer langdauernden Behandlung zu mehr oder minder ausgeprägten Nebennierenrindenatrophien kommt, die man mit ACTH verhindern kann.

b) In neuerer Zeit wurden hochwirksame synthetische Corticosteroide entwickelt, die schon in kleinsten Dosen eine Bremsung auf den Hypophysenvorderlappen und eine Hemmung auf die NNR-Eigensekretion ausüben. So entspricht z.B. die Wirkung von 50 mg Cortisol derjenigen von 1 mg des synthetischen Dexamethason ($\Delta 1\text{-}2\text{ Dehydro-}9\ \alpha\text{ fluoro-}16\text{-methyl-cortisol}$). Nach Zufuhr eines solchen hochwirksamen Steroids wird die Ausscheidung der Corticoid-Metaboliten im Harn kontrolliert und so der hemmende Einfluss deutlich, da die Ausscheidung des exogen verabreichten Steroids bei dem Ergebnis praktisch keine Rolle spielt.

V. 1. Wie schon erwähnt, lässt sich eine Störung der NNR-Funktion ausser der ACTH-Belastung noch durch den sog. "Cortisol-Hemm-Test" klären, wobei den Patienten 100 mg Cortisol intravenös injiziert und die Corticosteroide im Urin bestimmt werden. Wie bei allen übrigen Testen wird zuerst die normale Ruheausscheidung der NNRH im Urin bestimmt, darauf erfolgt die hormonanalytische Untersuchung der ausgeschiedenen Corticoide an je zwei Tagen nach der Cortisolinjektion. Es ist nach Di Raimondo und Forsham (28) bekannt, dass ungefähr 30% von der zugeführten Steroidmenge im Urin wieder erscheinen, so dass die tatsächliche

Hemmung der Eigenproduktion von Corticosteroiden ungefähr berechnet werden kann.

Nachfolgend werden drei Versuchsergebnisse eines "Cortisol-Hemm-Testes" in Tabelle 6 aufgeführt. Wir injizierten im ersten Fall einer adipösen Patientin 100 mg Cortisol, bei den anderen Fällen lag ein klassisches Cushing-Syndrom mit einer beidseitigen NNR-Hyperplasie vor.

Tabelle 6: "Cortisol-Hemm-Test"

Pat.	Ausgangswerte			1. Bestimmung			2. Bestimmung		
	mg/24 h			nach 100 mg F			nach 100 mg F		
	EN	SU	TA	EN	SU	TA	EN	SU	TA
17-KS	4.5	7.7	20.0	4.1	8.4	14.4	4.0	9.3	22.2
17-KGS	6.4	29.3	23.2	26.9	52.6	44.8	4.5	27.5	21.3
17-OH-CS	8.0	32.2	27.0	28.7	55.7	45.2	7.6	34.0	22.8
17-OH-20-keto- 21-CH ₃ -CS	1.6	2.9	3.8	1.8	3.1	0.4	3.1	6.5	1.5

Aus den Ergebnissen des ersten Falles (EN) geht eindeutig hervor, dass die Eigenproduktion an Corticosteroiden völlig durch die Cortisolinjektion sistiert. Die bestimmten 17-KGS- und 17-OH-CS-Werte am Tag nach der Cortisolinjektion (1. Bestimmung nach 100 mg F) bestehen aus den zu erwartenden annähernd 30% der injizierten Cortisolmengen. Bei den anderen Ergebnissen resultiert nur eine geringe Bremsung der endogenen Hormonbildung, woraus man schliessen könnte, dass bei diesen Patienten die vermehrte Ausscheidung von Corticosteroiden im Urin nicht durch eine übermässige Stimulierung der NNR durch adrenocorticotropes Hormon zu erklären ist.

Der Schluss einer Hemmung durch das Cortisol lässt sich auch bei Pat TA insofern nicht ohne weiteres ziehen, da es bekannt ist, dass die Ausscheidungswerte der 17-KS, 17-KGS und 17-OH-CS im Urin bei Patienten mit Cushing-Syndrom von Tag zu Tag stark variieren. So sind bei Pat. TA die 17-KS-Werte, die durch das Cortisol nicht beeinflusst werden, nach der Cortisolinjektion auffallend niedrig. Es könnten also auch die 17-KGS- und die 17-OH-CS-Werte an diesem Tage niedriger als die Ausgangswerte liegen, ohne dass eine Hemmung durch das Cortisol vorliegt. Diese Ergebnisse zeigen die geringe Verwertbarkeit des Cortisol-Hemmtestes, weil bei der Corticoidbestimmung die hemmende Wirkung des Cortisols auf die NNR wegen der hohen Zufuhr und der nur ungefähr bekannten Wiederausscheidung der zugeführten Steroidmenge nicht eindeutig erfasst werden kann.

2. Dagegen lässt sich die Hemmung der NNRH-Produktion nach Applikation des synthetischen Corticosteroids Dexamethason aus der Corticoidausscheidung im Urin klarer ersehen, da dieses Präparat, in kleinsten Mengen verabreicht, eine starke Bremsung auf den Hypophysenvorderlappen und auf die Sekretion der

NNRH ausübt, ohne dass das Steroid bei den Hormonbestimmungen selbst metho-
disch miterfasst wird.

Es handelt sich bei diesem bisher wirksamsten Derivat um die Einführung
eines Fluoratoms in C₉-Stellung sowie einer Methylgruppe an C₁₆ des Cortisolmo-
leküls. Im Tierexperiment sind die Wirkungen dieses Präparates denen der anderen,
synthetisch hergestellten Steroide weit überlegen (29). So fand sich gegenüber
Cortisol eine 190 mal stärkere Hemmung im Granulomtest, eine 700 mal stärkere
Nebennierenrindenhemmung, sowie eine 17 fache Wirkung im Glykogenspeiche-
rungstest. Aufgrund dieser Versuche war zu erwarten, dass Dexamethason auch
beim Menschen gegenüber Cortisol eine wesentlich stärkere Wirkung entfaltet.

In unseren Versuchen wurde eine maximale Dosis von 3 mg/Tag appliziert,
die schon eine sehr starke Hemmung der Nebennierenrindenhormon-Eigenproduk-
tion hervorrief. Eine Depression liess sich sogar noch bei einer Tagesgabe von
1 mg beobachten; bei dem "Cortisol-Hemm-Test" hingegen musste 100 mg Corti-
sol i. v. injiziert werden, um die gleiche Wirkung zu erzielen.

Aus den Ergebnissen, die in Tabelle 7 zusammengestellt sind, geht hervor,
dass bei längerer Verabfolgung die Ausscheidung sowohl der 17-KS als auch der
17-OH-CS stark gebremst wird.

Tabelle 7: Corticosteroideausscheidung bei Dexamethasonbehandlung

Patientin Nr 1: VA	17-KS	17-KGS	17-OH-CS	17-OH-20-keto- 21-CH ₃ -CS
Mittelwert aus 2 Nor- malbestimmungen mg/24 h	4.9	7.5	9.5	2.0
3 mg Dexamethason mg/24 h (prozentua- ler Abfall bezogen auf den Mittelwert)	4.8 (0)	5.9 (21)	6.8 (28)	0.9
Verabfolgung 7 Tage lang	0.8 (84)	5.4 (28)	8.0 (16)	2.6
	1.5 (69)	3.8 (49)	6.3 (34)	2.5
	2.0 (60)	4.2 (44)	5.3 (44)	1.1
	4.0 (18)	7.9 -	8.4 (12)	0.5
	3.5 (29)	1.8 (76)	4.4 (54)	2.6
	0.5 (88)	4.0 (47)	4.2 (56)	0.2

Patientin Nr 2: ST	17-KS	17-KGS	17-OH-CS	17-OH-20-keto- 21-CH ₃ -CS
Mittelwert aus 2 Normalbestimmungen mg/24 h	5.6	7.9	11.5	3.6
3 mg Dexamethason mg/24 h (prozentualer Abfall bezogen auf den Mittelwert)	5.0 (11)	3.9 (51)	5.0 (57)	1.1
Verabfolgung 7 Tage lang	4.8 (14)	4.2 (47)	7.2 (37)	3.0
	3.9 (30)	5.7 (29)	7.7 (33)	2.0
	2.9 (48)	6.2 (22)	7.4 (36)	1.2
	5.0 (11)	6.0 (20)	8.6 (25)	2.6
	4.8 (14)	5.2 (34)	5.3 (54)	0.1
	2.9 (48)	3.5 (56)	3.9 (66)	0.4
Patientin Nr 3: SU				
Mittelwert aus 2 Normalbestimmungen mg/24 h	9.0	30.9	34.7	3.8
3 mg Dexamethason mg/24 h (prozentua- ler Abfall bezogen auf den Mittelwert)	4.9 (46)	29.3 (5)	34.0 (2)	4.7
	7.0 (22)	26.5 (14)	33.3 (4)	6.8
Verabfolgung 4 Tage lang	7.0 (22)	21.3 (31)	22.9 (36)	0.9
	2.3 (74)	19.5 (37)	20.8 (40)	1.3
Patientin Nr 4: ST				
Mittelwert aus 2 Normalbestimmungen mg/24 h	10.1	12.9	15.5	2.6
3 mg Dexamethason mg/24 h (prozentua- ler Abfall bezogen auf den Mittelwert)	7.3 (28)	11.5 (11)	14.5 (7)	3.0
Verabfolgung 2 Tage lang	4.2 (59)	1.0 (92)	2.5 (84)	1.5
2 mg Dexamethason Verabfolgung	2.7 (73)	2.4 (87)	4.2 (73)	1.8
2 Tage lang	3.2 (68)	3.0 (77)	3.7 (79)	0.2

	17-KS	17-KGS	17-OH-CS	17-OH-20-keto- 21-CH ₃ -CS
Verabfolgung weitere 17 Tage ohne Cortico- steroidbestimmung				
1.5 mg Dexamethason	3.0 (70)	2.8 (78)	4.1 (74)	1.3
Verabfolgung 2 Tage	3.7 (63)	3.1 (76)	4.1 (74)	1.0
Verabfolgung weitere 5 Tage ohne Cortico- steroidbestimmung				
1 mg Dexamethason	2.2 (78)	2.8 (78)	4.7 (70)	1.9
Verabfolgung 2 Tage	2.7 (73)	3.6 (72)	4.5 (71)	0.9
Patientin Nr 5: HI				
Mittelwert aus 2 Normalbestimmungen	18.3	29.3	36.3	7.0
mg/24 h				
3 mg Dexamethason mg/24 h (prozentua- ler Abfall bezogen auf den Mittelwert)	13.9 (24)	24.5 (16)	34.7 (5)	10.2
Verabfolgung 3 Tage	6.5 (72)	8.0 (73)	12.8 (65)	4.8
	4.5 (75)	9.5 (68)	12.0 (67)	2.5
2 mg Dexamethason	9.0 (51)	17.4 (41)	21.6 (41)	4.2
Verabfolgung 3 Tage	4.2 (77)	14.2 (51)	16.0 (56)	1.8
	3.9 (79)	9.0 (69)	10.8 (70)	1.8
Corticosteroidbe- stimmung nach Abset- zung des Mittels	8.3 (55)	17.5 (40)	21.6 (40)	4.1
	13.4 (27)	30.4 -	41.0 -	10.6
Patientin Nr 6: BO				
Mittelwert aus 2 Normalbestimmungen	4.7	9.3	10.5	1.2
mg/24 h				
Pat. BO erhielt: 10 x 4 mg Dexamethason /die, 10 x 3 mg, 5 x 2,5 mg 5 x 2 mg, 4 x 1.0 mg.				
Anschliessend erfolgten die Corticosteroidbest. .				
1 mg Dexamethason				
Verabfolgung 1 Tag	2.6 (45)	3.3 (65)	4.4 (58)	1.1

	17-KS	17-KGS	17-OH-CS	17-OH-20-keto- 21-CH ₃ -CS
Corticosteroidbe-	1.9 (60)	7.6 (18)	9.1 (13)	1.5
stimmung an 8 Tagen	2.1 (55)	1.6 (83)	2.5 (76)	0.9
nach Absetzung des	1.6 (66)	3.6 (61)	4.4 (58)	0.8
Mittels	1.2 (75)	1.3 (86)	1.5 (86)	0.2
	2.4 (49)	4.0 (57)	4.9 (53)	0.9
	3.3 (30)	8.0 (14)	8.9 (8)	0.9
	2.3 (51)	4.5 (52)	5.1 (52)	0.6
	3.8 (19)	8.5 (9)	9.3 (11)	0.8

VI. Da bei Dexamethason, dem an C₉ in α -Stellung fluorierten und an C₁₆ in α -Stellung methylierten Prednisolon, die Rückwirkung auf die homöostatische Rückkoppelung der Hypophyse nach den Arbeiten von Bunim u. Mitarb. (29) stärker als die äquivalente Menge von Cortisol und Prednisolon sein soll, haben wir die Dosis von 3 mg Dexamethason gewählt. Vergleicht man die in Prozent angegebene Hemmung der Inkretion endogener Corticosteroide nach 100 mg Cortisol, dann darf zumindest auf eine über 30 mal stärkere Hemmwirkung des Dexamethason im Vergleich zu Cortisol angenommen werden. Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Bunim u. Mitarb. (29), die eine 25 bis 375 mal stärkere depressive Wirkung auf die Hypophyse ermittelt haben.

Bierich und Geyer (30) konnten mit der Bestimmung des Plasma-Cortisolspiegels vor und nach ACTH zeigen, dass nach Dexamethasongaben die Ansprechbarkeit der NNR auf einen hypophysären Stimulus stark unterdrückt wird. Beide Autoren vermuten neben der Bremsung der ACTH-Inkretion auch eine primäre Hemmung des Dexamethason auf die NNR und ihre Biosynthese. Damit wäre zumindest die intensivere Wirkung des Dexamethason im Vergleich zu Cortisol und Prednisolon auf die endogene Hormonproduktion erklärt, als es die jeweilige "antiphlogistische" Wirkung der einzelnen Corticosteroide erwarten lässt.

Diese Befunde bedeuten für die Klinik und besonders für die heute so häufig geübte Therapie mit synthetischen Corticosteroiden eine unablässige Forderung, dass nämlich jede pharmakodynamische Hormonbehandlung mit Dexamethason unbedingt mit einer nachfolgenden ACTH-Therapie abgeschlossen werden muss.

Dem Absinken der Hormonproduktion geht ja regelmässig eine Atrophie oder regressive Veränderungen der NNR parallel, weil der exogen erhöhte Corticosteroidspiegel im Blut und Gewebe durch die Rückkoppelung der Hypophyse und NNR die ACTH-Inkretion bremst. Das Hypophysenvorderlappenhormon ACTH stimuliert ja nicht nur die Biosynthese und Sekretion der Corticosteroide, sondern fördert auch die Durchblutung und das Wachstum der NNR.

Die nach langzeitiger Dexamethasonbehandlung eintretende NNR-Atrophie lässt sich jederzeit mit ACTH-Gaben sowohl morphologisch als auch funktionell

anregen, weil es sich bei diesen Änderungen nach Kracht (31) um reversible Vorgänge handelt.

C. In der vorliegenden Arbeit werden zwei brauchbare Modifikationen der Corticosteroidbestimmung im Harn miteinander verglichen und einzelne methodische Änderungen vorgeschlagen. Die Bestimmungsverfahren in eigener Modifikation nach Vestergaard, Appleby, Norymberski u.a. erlauben den quantitativen Nachweis der 17-KS, 17-KGS, 17-OH-CS und 21-Methylsteroiden mit einer statistischen Fehlerbreite von 3,7% für die 17-KS, 11,5% für die 17-KGS und 6,6% für die 17-OH-CS.

An einem Probandengut von 35 gesunden Frauen werden die Normalwerte, Standardabweichungen und mittleren Fehler für die 4 verschiedenen Corticoidfraktionen im Urin durch Mehrfachbestimmungen ermittelt. Es werden hier erstmals an einem grösseren Untersuchungsgut die Mittelwerte mit mittlerem Fehler der 17-Hydroxy-20-keto-21-methylsteroiden genau ermittelt.

In einer zweiten Versuchsreihe wird der Einfluss des synthetischen Corticosteroids Dexamethason auf die ACTH- und endogene Cortisol-Inkretion bei Patienten während langzeitiger Verabreichung untersucht. Dabei zeigt sich nach Tagesdosen von 3 mg und 1 mg Dexamethason ein signifikanter depressiver Effekt auf die Hormonproduktion der NNR, der stärker ist als derjenige nach pharmakologisch äquivalenten Mengen von Cortisol.

Die Hemmung der ACTH-Inkretion mit Dexamethason eignet sich nur bedingt als sog. "Dexamethason-Hemm-Test" zur differentialdiagnostischen Klärung einer hypophysären oder autonomen NNR-Überfunktion bei den verschiedenen Formen der Cushing-Syndrome.

D.

1. Hechter and Pincus, G.: Physiologic. Rev. 34, 459 (1954)
2. Bongiovanni und Mitarb.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 87, 282 (1954)
3. Porter, C.C., and Silber, R.H.: Journal of Biol. Chem. 185, 201 (1950)
4. Norymberski, J.K., Stubbs, R.D., West, H.F.: Assessment of Adrenocortical Activity by Essay of 17-Ketogenic Steroids in Urine, Lancet 1 (1953)
5. Schriefers, H. und Korus, W.: Hoppe-Seyler's Zeitschr. für Physiol.-Chemie Bd. 313
6. J.K. Norymberski und R.D. Stubbs: Biochem. J. 64, 168, (1956)
7. H. Breuer und L. Nocke: Z. Vitamin-, Hormon- und Fermentf. 9, 28, (1957)
8. E. Diszfalusy, L.O. Plantin and G. Birke and Shirley C. Ingall and J.K. Norymberski: Acta Endocr. 27, 275 - 280 (1958)
9. Appleby, J., Gibson, G., Norymberski, J.K., Stubbs, R.D.: Biochem. J. 57: XIV, (1954)
10. G. Birke, M.D., E. Diszfalusy, M.D. and L.O. Plantin, Dipl.ing.: J. of Clin. Endocr. and Met. Nr 7 (1958)
11. Drechter, I.J., G.R. Scism, S. Stern, S. Peurson and T.H. Mc Garack: J. Clin. Endocr. 12, 55 (1952)
12. Zimmermann, W.: Z. physiol. chem. 233, 257 (1935)
Z. physiol. chem. 245, 47 (1936)
13. W. Zimmermann, H.U. Anton und D. Pontius: Z. physiol. chem. 289, 91, (1952)
14. H. Wu und C.Y. Chou: Chin. J. Physiol. 11, 413 (1937)
15. N.H. Callow, R.K. Callow und C.W. Emmens: Biochem.J. 32, 1312 (1938)
16. Vestergaard, P.: Acta Endocr. (Copenh) 8, 193 (1951)
17. Norymberski J.K.: Determination of Urinary Corticosteroids, Nature 170: 1074, 1952
18. Appleby, J., Gibson, G., Norymberski J.K. and Stubbs, R.: Biochem. J. 60: 453, (1955)
19. Chr. Hamburger: Acta Endocr.: 9, 129 - 134 (1952)
20. M. Jørgensen: Acta Endocr. 26, 429 (1957)

21. Talbot, N.B., Berman, R.A., Mac. Lachlan, E.A.:
J. biol. Chem. 143, 211 (1942)
22. H. Jenninger: Diss. München 1961
23. S.L. Tompsett and D.C. Smith: Acta Endocr. 20, 304 (1955)
24. A. Moxham and J.D.N. Nabarro: J. clin. Path. 9, 356 (1956)
25. R. Raftopoulos, H. Staudinger und L. Weissbecker:
Clinica Chemica Acta, Vol 4. (1959)
26. Husslein, H. und Schüller, E.: Archiv für Gynäk. Bd. 187, 360 (1956)
27. W.M. Politzer, M.D. Prague, A. Tucker: Lancet, 778-779 (1958)
28. V.C. Di Raimondo and P.H. Forsham: Metabolism 7, 5 (1958)
29. Bunim, J.J., Black, R.L., Lutwak, L., R.E. Peterson, and G.D. Whedem:
Arthritis e. Rheumat. 1, 313 (1958)
30. Bierich, J.R.: I. Internat. Endocrinol. Kongress Kopenhagen,
1960

Geyer, G.: I. Internat. Endocrinol. Kongress Kopenhagen,
1960
31. Kracht, J.: Symp. der dtsh. Ges. f. Endocrinologie 1958 Kiel

Herrn Professor BODECHTEL danke ich für die
freundliche Überlassung des Themas,
Herrn Dr. SCHWARZ für wertvolle Hinweise
und Anregungen.

LEBENS LAUF

Am 7. Juli 1935 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Christian Kalmbach und seiner Ehefrau Pauline geb. Mürdel als sechstes von sieben Kindern in Duisburg-Meiderich geboren. Im Herbst 1937 verzogen meine Eltern nach Rheinhausen, wo ich die Volksschule von 1941 bis 1946 besuchte. Im Frühjahr 1946 trat ich in die Oberschule in Rheinhausen ein. 1951 wechselte ich vom Lyceum in die Jungenschule des naturwissenschaftlichen Gymnasiums über, wo ich 1955 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1955 begann ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität Münster. Dort legte ich im Oktober 1957 die ärztliche Vorprüfung ab. Mein Studium setzte ich im Sommersemester 1958 an der Medizinischen Fakultät der Universität München fort, wo ich am 13. Dezember 1960 mein Staatsexamen ablegte.

